

专利合作条约

PCT

国际初步审查报告

(PCT 条约 36 和细则 70)

REC'D 28 OCT 2003

WIPO

PCT

10/518940

申请人或代理人的档案号 PCTIC0302CN	关于后续行为 参见“传送国际初步审查报告的通知”(PCT/IPEA/416 表)	
国际申请号 PCT/CN03/00417	国际申请日(日/月/年) 30.5 月 2003 (30.05.03)	优先权日(日/月/年) 17.6 月 2002(17.06.02)
国际专利分类(IPC)或者国家分类和 IPC 两种分类 IPC7 C07K5/062		
申请人 厦门大学 等		

1. 本国际初步审查单位已作出国际初步审查报告并依照条约第 36 条将其传送给申请人。

2. 本报告共计 3 页, 包括扉页。

☒ 本报告还有附件, 即修改后的并且作为本报告基础的说明书修改页、权利要求书修改页和/或附图修改页, 和/或对本国际初步审查单位所作出的更正页(见 PCT 细则 70.16 和行政规程 607)。

这些附件共计 2 页

3. 本报告包括关于下列各项的内容:

I ☒ 报告的基础

II ☐ 优先权

III ☐ 不作出关于新颖性、创造性和工业实用性的意见

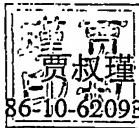
IV ☐ 缺乏发明的单一性

V ☒ 按条约 35(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见; 支持这种意见的引证和解释

VI ☐ 引用的某些文件

VII ☐ 国际申请中的某些缺陷

VIII ☐ 对国际申请的某些意见

提交要求书的日期 30.5 月 2003 (30.05.03)	完成本报告的日期 25.9 月 2003 (25.09.03)
国际初步审查单位名称和地址 IPEA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451	受权官员  电话号码: 86-10-62093933

I. 报告的基础

1. 关于国际申请中各个部分：*

☐ 原始提交的国际申请。

☒ 说明书, 第 1, 3, 4, 6-8 页, 原始提交的,
第 页, 要求书提交的,
第 2, 5 页, 24.7 月 2003 (24.07.03) 的信件提交的。

☒ 权利要求, 第 1-9 项, 原始提交的,
第 项, 条约第 19 条修改的(附有说明),
第 项, 要求书提交的。
第 项, 的信件提交的。

☐ 附图, 第 页, 原始提交的。
第 页, 随要求书提交的,
第 页, 的信件提交的。

☐ 说明书中的序列表部分
第 页, 原始要求提交的,
第 页, 随要求书提交的,
第 页, 的信件提交的。

2. 关于所使用的语言, 除本项下另有说明外, 本国际初步审查单位所获得的或者已向本国际初步审查单位提交的上述所有部分, 所使用的语言均为提交本国际申请时所使用的语言。

本国际初步审查单位所获得的或向本国际初步审查单位提交的这些部分所使用的语言是 中文 ,
这种语言是

☐ 为了国际检索而提交的译本所使用的语言(细则 23.1 (b))。☐ 本国际申请公布时所使用的语言(细则 48.3 (b))。☐ 为了国际初步审查而提交的译本所使用的语言(细则 55.2 和/或 55.3)。

3. 关于本国际申请中所公开的任何核甙酸和/或氨基酸的序列, 本国际初步审查是根据下面的序列表进行的:

☐ 国际申请中所包含的书写形式的序列表。☐ 与国际申请同时提交的计算机可读形式的序列表。☐ 后来以书写形式向本国际初步审查单位提交的序列表。☐ 后来以计算机可读的形式向本国际初步审查单位提交的序列表。☐ 已提交了关于后来提交的书写形式的序列表没有超出原始提交的国际申请所公开的范围的说明。☐ 已提交了关于以计算机可读的形式记载的信息是与书写形式的序列表相同的说明。

4. 修改删除了以下内容:

☐ 说明书, 第 页☐ 权利要求, 第 项☐ 附图, 第 页, 图5. ☐ 由于(某些)修改被认为超出了原始公开的范围, 如补充栏所示, 因此本报告是按照如同没有修改的情况作出的(细则 70.2(c)). **

* 按照条约第 14 条答复通知时向受理局提交的替换页, 在本报告中被称为“原始提交的”, 这些替换页不作为本报告的附件, 因为它们没有包含修改(细则 70.16 和 70.17)。

** 任何包含这种修改的替换页, 都必须在第 1 项中指明, 并作为本报告的附件。

V. 按条约 35 条(2)关于新颖性、创造性或工业实用性的推断性意见；支持这种意见的引证和解释

1. 意见

新颖性(N)	权利要求 1—9	是
	权利要求	否
创造性(IS)	权利要求 1—9	是
	权利要求	否
工业实用性(IA)	权利要求 1—9	是
	权利要求	否

2. 引证和解释（细则 70.7）

权利要求 1—9 要求的是丙—谷二肽的合成方法，该方法与现有技术公开的方法不同，而且对于本领域技术人员是非显而易见的，并且能够在工业上使用，因此权利要求 1—9 具有新颖性，创造性和实用性。

Gly-L-Gln) 和丙氨酰谷氨酰胺(丙-谷二肽,L-alanyl-L-glutamine, L-Ala-L-Gln)。动物和人体实验证明, 在体内, 这两种二肽很快被降解为其组成氨基酸, 半衰期很短, 血液中只能检测到少量的二肽, 仅有微量的二肽从尿中排出。说明 Gln 二肽可有效地利用而且不会在血液中积聚, 避免了二肽可能产生的药理及生理性损害。实验证明, 健康人体长期静脉滴注 L-Ala-L-Gln 二肽没有任何副作用及不良反应, 不影响正常的肾功能。用化学方法合成的 L-Ala-L-Gln 经纯化其溶解度是 Gln 单体的 20 倍, 在储存和加热灭菌时也很稳定, 而进入体内后即迅速分解成 Gln 而发挥作用, 使 Gln 在 TPN 中的应用方便可行。

丙-谷二肽合成方法有如下 4 种:

1、首先将 Gln (谷氨酰胺) 的末端氨基进行保护, 例如形成苄氧羰基保护的谷氨酰胺(Cbz-Gln); 第二步, 将 Cbz-Gln 的酰氨基保护形成 Cbz-Gln (OC₁₃H₉); 第三步, 将 Cbz-Gln (OC₁₃H₉) 的羧基中的羟基保护形成 Cbz-Gln (OC₁₃H₉) OMe; 第四步, 通氢气形成 Gln (OC₁₃H₉) OMe; 第五步, 加入 Cbz-Ala; 第六步, 对 Cbz-Ala 活化; 第七步, Cbz-Ala 和 Gln (OC₁₃H₉) OMe 结合成肽; 第八步, 皂化脱甲酯; 第九步, 酸化脱去全部保护, 形成丙-谷二肽。(文献 Yasutsugu Shimomishi, Studies on the Synthesis of Peptides Containing Glutamine as the C-Terminal. Y.Bull.Chem. Soc.Jpn. 1962,35,1966) 该方法反应步骤太多, 而且试剂昂贵, 无实际应用价值。

2、利用苄氧羰基保护的丙氨酸(Z-Ala)与 N-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu) 在二环己基碳二亚胺(DCC)作用下, 于 20~25℃反应 5 小时, 过滤去二环己基脲, 然后与未保护的 Gln 于碳酸氢钠的水溶液中进行合成。产物在甲醇中还原氢化, 脱去保护基, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Katoh,T.Kurauchi,M.Eur.Pat311,057,12Apr.1989) 该方法的试剂昂贵, 而且 DCC 反应后的产物难以除去, 生产过程复杂。

3、利用光气(COCl₂)与 Ala 反应生成混酐, 然后与 Gln 在水中反应, pH 保持在 10.2。最后在酸溶液中脱去保护, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Frerst,P.Pfaendetr,P.Ger.Offen.DE 3206,784.01Sep1983) 此方法的反应步骤少, 但光气为剧毒气体, 而且该反应难以反应完全, 对人体危害较大。

4、利用手性试剂氯代丙酸通过 SOCl₂ 活化, 形成酰氯, 然后与 Gln 在 NaOH 的水溶液中反应, pH 保持在 10。产物为氯代丙酰谷氨酰胺, 再与液氨在一定的压力下反应, 即可得到丙-谷二肽。(文献 Takahiro Sano,Toru Sugaya,Process Research ang Development of l-Alanyl-l-glutamine,a Component of Parenteral Nutrition.Organic Process Research and Development.2000,4,147-152) 该反应的原料为手性试剂, 价格较高, 在合成酰氯步骤中,

三苯基酸 30mmol 用 30mL 四氢呋喃溶解，滴加到 N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol，和六氯乙烷 30mmol,10mL 四氢呋喃的混合体系内，于 10℃反应 20 分钟后，滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺，水 20mL，环己烷 20mL 的混合液中，反应中用氢氧化钠调 pH 为 12，反应温度为 25℃，滴加后反应 30 分钟。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用 20%溴化氢/冰乙酸室温反应 5 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用甲醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 50%。

实施例 4

N-(O,O-二甲基)磷酰丙氨酸 10mmol，三苯基磷 20mmol 和六氯乙烷 30mmol 分别加入圆底烧瓶，再加入 20mL 甲苯，于 5℃反应 1 小时后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺，20mL 水，5mL 乙醇的混合液中，反应中用碳酸钠调 pH 为 9.5，反应温度为 5℃，滴加后反应 10 分钟。然后用磷酸酸化至 pH 为 1.0，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 15 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 40%。

实施例 5

三苯基磷 20mmol 用 10mL 四氢呋喃溶解，滴加到 N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸 10mmol、30mmol 六氯乙烷和 10mL 四氢呋喃的混合体系内，于-5℃反应 2 小时后，滴加到含有 10mmol 谷氨酰胺，20mL 水，20mL 乙醇的混合液中，反应中用氢氧化钠 10mmol，然后用碳酸氢钠调 pH 为 9.5，反应温度为-5℃，滴加后反应 2 小时。然后用浓盐酸酸化至 pH 为 3，水相浓缩后用饱和氯化氢/冰乙酸室温反应 5 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用乙醇-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 35%。

实施例 6

六氯乙烷 30mmol 用 20mL 二氯甲烷溶解，滴加到 10mmol N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸、30mmol 三苯基磷和 10mL 二氯甲烷的混合体系内，于 0℃反应 40 分钟后，滴加到含有 30mmol 谷氨酰胺，20mL 水，10mL 环己烷的混合液中，反应中用氢氧化钾调 pH 为 13，反应温度为 20℃，滴加后反应 30 分钟。然后用稀硝酸酸化至 pH 为 1.5，水相浓缩后用三氟乙酸室温反应 10 小时，反应结束后加入乙醚 50mL，析出固体，将固体用 1,4-二氧六环-水重结晶得产物 L-Ala-L-Gln。产率 60%。

实施例 7

10mmol N-(O,O-二乙基)磷酰丙氨酸，10mmol 三苯基磷和 15mmol 六氯乙烷分别加入圆底烧瓶，再加入 20mL 乙腈，于 15℃反应 2.5 小时后，滴加到含有 30mmol 谷氨

Rec'd PCT/PTO 16 DEC 2004

PATENT COOPERATION TREATY

REC'D 28 OCT 2003

TRANSLATION

PCT

WIPO PCT

10/518940

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCTIC0302CN		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CN03/00417	International filing date (day/month/year) 30.May2003 (30.05.03)	Priority date (day/month/year) 17.Jun.2002(17.06.02)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC7 C07K5/062			
Applicant XIAMEN UNIVERSITY et al.			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and /or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty ,inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2)with regard to novelty ,inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application.</p>			

Date of submission of the demand 30.May2003 (30.05.03)	Date of completion of this report 25. SEP. 2003 (25. 09. 03)
Name and mailing address of the IPEA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Telephone No.86-10-62093933

Form PCT/IPEA/409(cover sheet)(July 1998)

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:

☐ the international application as originally filed☒ the description:

pages 1,3,4,6-8, as originally filed

pages, filed with the demand

pages 2,5, filed with the letter of 24.Jul.2003(24.07.03)

☒ the claims:

Nos 1-9, as originally file

Nos, as amended (together with any statement) under Article 19

Nos, filed with the demand

Nos, filed with the letter of

☐ the drawings:

sheets/fig, as originally filed

sheets/fig, filed with the demand

sheets/fig, filed with the letter of

☐ the sequence listing part of the description:

pages, as originally filed

pages, filed with the demand

pages, filed with the letter of

2. with regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language Chinese which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages☐ the claims No. ☐ the drawings, sheets/fig5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item I and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement:**

Novelty (N)	Claims 1-9	YES
	Claims	NO
Inventive step (IS)	Claims 1-9	YES
	Claims	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-9	YES
	Claims	NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

Claims 1—9 demand a process of producing Ala-Glu dipeptide. The present method is different from previous technology in the art. It is not obvious to a person skilled in the art at the prescribed relevant date. The method can be used in industry. Claims 1-9 shall be considered novel and to involve an inventive step, and shall be considered industrially applicable.